

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|---|--|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation 6: C12N 15/57, 9/50, 15/11, 15/15, A61K 38/48, C12Q 1/37, A61K 38/55, C12N 15/79 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/43425 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. November 1997 (20.11.97) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02388 | | (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Mai 1997 (09.05.97) | | | |
| (30) Prioritätsdaten: 196 19 366.4 14. Mai 1996 (14.05.96) DE | | Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> | |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE). | | | |
| (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KIY, Thomas (DE/DE); Loreleistrasse 14, D-65929 Frankfurt am Main (DE). SCHULTZ, Joachim (DE/DE); Baumgartenring 28, D- 72119 Ammerbuch (DE). | | | |

(54) Title: CATHEPSIN-L, THE PRE-PROFORM THEREOF AND THE CORRESPONDING PROPEPTIDE FROM CILIATES

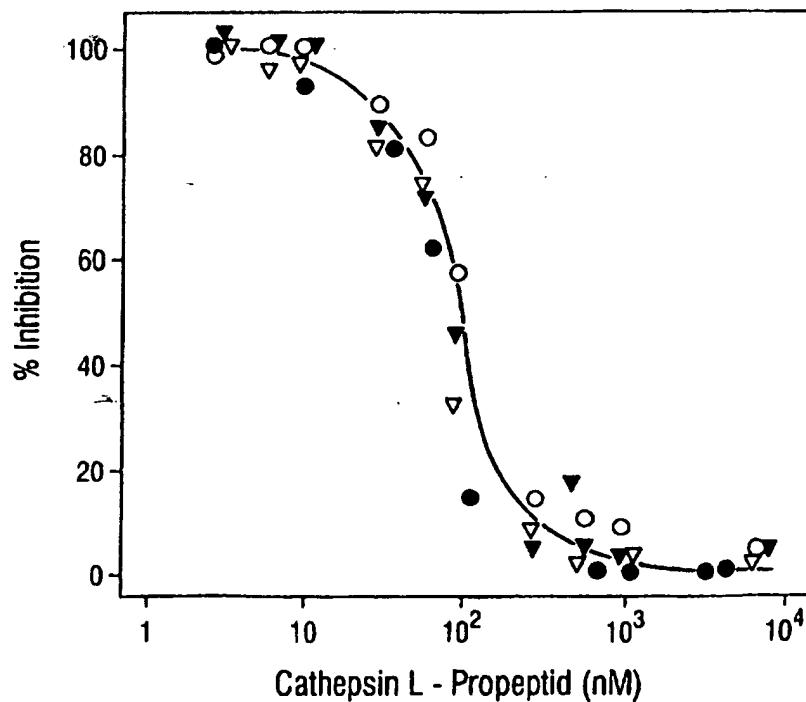
(54) Bezeichnung: CATHEPSIN-L, DESSEN PRÄPROFORM UND DAS ENTSPRECHENDE PROPEPTID AUS CILIATEN

(57) Abstract

The invention relates to the extraction of the pre-proform of cathepsin-L, the leader sequence thereof, extraction of the cathepsin-L and the associated propeptide, obtained from ciliates, in particular paramecium. It also relates to the use of said peptides and a process for the preparation of the cathepsin-L from ciliates.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Gewinnung der Präproform des Cathepsin-L, deren Leadersequenz, des Cathepsin-L und des dazugehörigen Propeptid aus Ciliaten - insbesondere Paramecium, die Verwendung dieser Peptide und ein Verfahren zur Herstellung des Cathepsin-L aus Ciliaten.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauritanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Irland | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LJ | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Beschreibung

Cathepsin-L, dessen Präproform und das entsprechende Propeptid aus Ciliaten

Die Erfindung betrifft die Gewinnung der Präproform des Cathepsin-L, deren Leadersequenz, des Cathepsin-L und des dazugehörigen Propeptid aus Ciliaten - insbesondere Paramecium, die Verwendung dieser Peptide und ein Verfahren zur Herstellung des Cathepsin-L aus Ciliaten.

) Der Befund, daß Propeptide verschiedener Proteasen - nachdem sie bei der Aktivierung der Protease-Zymogene freigesetzt wurden - als Proteaseinhibitoren wirken können, ist bekannt. Das Propeptid der Elastase aus *Pseudomonas aeruginosa* etwa lagert sich nach der Abspaltung an die Elastase und führt damit zur Inaktivierung des Enzyms (Kessler & Safrin, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269, 22726). Die Propeptide des Papains und der Papaya-Proteinase IV wirken selektiv als Inhibitoren der reifen Papaya-Proteasen und der verwandten Cathepsine B und L aus der Rattenleber (Taylor et al., 1995, *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 80). Auch die Propeptide weiterer Cathepsine können als Proteaseinhibitoren wirken. So inhibiert das synthetisch hergestellte Propeptid des humanen Procathepsin-D bovinus Cathepsin D (Vagner et al., 1993, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 58, 435).

Cathepsin-L, eine Protease, spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen Krankheitsbildern. So ist dieses Enzym wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung bei der Invasivität von Tumoren und der Bildung von Metastasen (Pike, 1991, *Dissertation Abstr. Intern.*, 53, 4645). Auch beim Eindringen pathogener Bakterien oder parasitischer Protozoen in das Wirtsgewebe kann diese Protease beteiligt sein. Weiterhin ist Cathepsin-L an der Degradation der Knochenmatrix beteiligt. Bei der Behandlung von Osteoporose erscheint dieses Enzym daher als lohnendes Target (Pharma Japan, Sept. 1995, 1468, 23).

Schließlich sei erwähnt, daß Cathepsin-L auch an der Ausprägung inflammatorischer Krankheiten wie Arthritis beteiligt ist.

Die Identifizierung geeigneter Cathepsin-L-Inhibitoren könnte ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung geeigneter Präparate für die Therapie der genannten Erkrankungen darstellen. Weiterhin wäre auch eine geeignete Quelle zur Gewinnung größerer Mengen von Cathepsin-L von großem Vorteil. Das Enzym ließe sich in Screening-Systemen zur Auffindung geeigneter Protease-Inhibitoren einsetzen. Darüber hinaus ließe es sich z.B. in Wundsalben einsetzen, wo es den Abbau nekrotischen Gewebes katalysieren könnte.

Die vorliegende Erfindung betrifft demgemäß eine Cathepsin-L-Präproform, erhältlich aus Ciliaten, vorzugsweise aus Paramecium, besonders bevorzugt aus Paramecium tetraurelia, und die für ein solches Protein kodierende DNA-Sequenz.

Die Erfindung betrifft ferner ein Cathepsin-L aus Ciliaten, vorzugsweise aus Paramecium, besonders bevorzugt aus Paramecium tetraurelia und die zugehörige DNA-Sequenz, ein Verfahren zu dessen Herstellung aus Ciliaten, sowie dessen Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Wunden.

Das Cathepsin-L gemäß der vorliegenden Erfindung kann ferner Anwendung zur Identifizierung geeigneter Inhibitoren - beispielsweise durch sog. Molecular Modeling dienen.

Ferner wird durch die vorliegende Erfindung ein Cathepsin-L-Propeptid und dessen DNA-Sequenz aus Ciliaten, vorzugsweise aus Paramecium, besonders bevorzugt aus Paramecium tetraurelia bereitgestellt.

Das Propeptid des Cathepsin-L aus Ciliaten ist ein hochspezifischer Inhibitor desselben und eignet sich demgemäß zur Herstellung von Arzneimitteln zur

Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen, metastasierenden Tumoren, bakteriellen Infektionen, Infektionen mit parasitären Protozoen oder der Osteoporose.

Die vorliegende Erfindung stellt ferner eine Präsequenz, entsprechend der Leader- oder Signalsequenz des Cathepsin-L aus Ciliaten, vorzugsweise aus Paramecium, besonders bevorzugt aus Paramecium tetraurelia, bereit, welche bei der Exprimierung rekombinanter Peptide oder Proteine in die entsprechende Leader- oder Signalsequenz übersetzt wird, was zur Ausschleusung der rekombinant exprimierten Peptide oder Proteine aus den Ciliatenzellen führt.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden und anhand der Beispiele näher erläutert.

Vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die Isolierung zweier Proteasen aus der Cathepsin-L Unterfamilie aus dem Ciliaten Paramecium (Protista). Die Sequenzierung der klonierten cDNA zeigt, daß die Übereinstimmung zu bereits beschriebenen Cathepsin-L Formen aus Mammalia und Protisten maximal 30 % beträgt, daß aber die charakteristischen Cathepsin-L-Motive sowohl in der Präproregion als auch im eigentlichen Enzym vorhanden sind. Die Proregion kodiert einen 86 Aminosäuren langen Abschnitt, der das typische ERFNIN-Motiv aufweist. Die Proregion wurde in *E. coli* exprimiert. Das isolierte Propeptid inhibierte effizient (im nanomolaren Bereich) das Cathepsin-L aus Paramecium. Andere Cystein-Proteasen hingegen, etwa Papain und Mammalia Cathepsin-B, -G und -H wurden selbst bei Propeptidkonzentrationen von 13 μ M nicht gehemmt. Das Propeptid stellt somit einen effektiven und spezifischen Cathepsin-L Inhibitor dar. Basierend auf diesen Daten ließe sich ein potenter und hochspezifischer Inhibitor für den chemotherapeutischen Einsatz bei der Behandlung der genannten Krankheitsbilder entwickeln.

Beispiel

Cathepsin-L Assay

Als Substrat wurde ^{32}P -Phosphorylase a (ca. 5×10^4 cpm/min) verwendet. Ein Testansatz (30 μl) enthielt 10 μM Substrat, 12 mM Tris/HCl (pH 7,0), 50 μM EDTA, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 5 mM Coffeine und 6,7 μg BSA. Das Abstoppen erfolgte nach 10 minütiger Inkubation bei 30°C durch Zugabe von 200 μl Trichloressigsäure (20 % w/v). Die Radioaktivität der nicht-fällbaren Peptide wurde im Überstand nach Zentrifugation bestimmt. Eine Unit Enzymaktivität entspricht der Menge, die 1 μmol lösliches ^{32}P -Phosphopeptid/min freisetzt.

Reinigung des Cathepsin-L

Als Quelle dienten Massenkulturen des Ciliaten *Paramecium tetraurelia*. Cathepsin-L kann sowohl aus den Zellen als auch in großen Mengen aus dem Kulturmedium gewonnen werden, da die Zellen das Enzym auch sezernieren.

Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in 50 mM Tris/HCl (pH 7,0), 5 mM EDTA mittels einer French-Press homogenisiert. Zelldebris wurde über Zentrifugation (23.000 x g, 60 min; 100.000 x g, 60 min) entfernt. Der Überstand wurde auf eine mit 20 mM Tris/HCl (pH 7,0) äquilierte DEAE-Sepharose®-Säule aufgetragen. Etwa die Hälfte der Proteaseaktivität eluierte mit dem Durchbruch. Die Säule wurde mit 250 mM NaCl gewaschen. Die restliche Proteaseaktivität wurde mit 450 mM KCl eluiert. Danach wurden die aktiven Fraktionen über eine Sephadryl® S-100 HR-Säule gereinigt. Die Protease eluierte bei etwa 27 kDa. Die gepoolten aktiven Fraktionen wurden im Anschluß auf eine Mono-Q-Säule aufgetragen. Die Elution fand mittels eines linearen Gradienten (60 ml 100 bis 350 mM NaCl) statt. Über diesen Schritt konnten zwei aktive Proteasen (30 kDa und 33 kDa) getrennt werden. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Gegenüber ^{32}P -

Phosphorylase a als Substrat lag das pH-Optimum beider Isozyme bei 6,5; das Temperatur-Optimum bei 56°C. Sulfhydryl-Protease spezifische Inhibitoren (z.B. Cystatin, Leupeptin und TLCK) reduzierten die Aktivität drastisch. Dagegen zeigten Inhibitoren spezifisch für Serin-Proteasen (Aprotinin), Metallo-Proteasen (EDTA) und Asp-Proteasen (Pepstatin) keine inhibierende Wirkung. Anhand des Verdauungsmusters von Phosphorylase und BSA konnte gezeigt werden, daß es sich um zwei Endoproteinase-Isozyme handelt.

Aminosäuresequenzierung

Die Proteine wurden aus dem SDS-Gel auf eine Polyvinyliden-difluorid Membran geblottet und die entsprechenden 30 kDa- und 33 kDa-Banden ausgeschnitten. Für die Sequenzierung von Proteinbruchstücken wurden die Proteine vor der SDS-PAGE mit BrCN (350 µg/10 µg Protein) gespalten. Die Sequenzierung wurde auf einem Applied Biosystems Sequencer durchgeführt. Der NH₂-Terminus der 30 kDa-Bande ist: GAEVDWTDNKKVKYPAVKNQ der der 33 kDa-Bande: GAEVDXTXNK (X ist nicht geklärt). Auch die Sequenzierung der BrCN-Bruchstücke zeigte, daß es sich um identische Enzymproteine handelt, die eventuell nur unterschiedlich prozessiert werden. Hier wurde für beide Proteine folgende Sequenz ermittelt: DSAFEYVADNGLAEAKDYPYYASD. Der Vergleich mit der EMBL/Gene bank über das FASTA-Programm erbrachte hinsichtlich des NH₂-Terminus keine Übereinstimmung mit bekannten Proteinen, dagegen zeigte das Alignment des internen 24er-Peptids eindeutige Übereinstimmungen mit 19 verschiedenen Cystein-Proteasen.

Amplifizierung und Subklonierung von Cathepsin-L

Oligonukleotide wurden hergestellt basierend auf der AS-Sequenzierung und unter Berücksichtigung des Ciliaten-codon-usage. Die verwendeten Primer waren: Primer 1 (sense) 5'-GCAGGGTACCGGWGCHGAAGTHGAYTGGACWGA-TAAAYAARAARG-3' abgeleitet aus dem NH₂-terminalen Peptid GAEVDWDNKKVK und Primer 2 (antisense) 5'-TARTANGGRTARTCYTTNGC-YTC-3' abgeleitet aus der internen Peptidsequenz EAKDYPYY. Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer Thermal-Cycler (30 Zyklen, bei 94°C, 55°C und 72°C je 1 min) durchgeführt. Mittels dieser Primer wurde aus einer Paramecium-cDNA-Bibliothek ein 275 bp langes Fragment amplifiziert. Über die Sequenzierung dieses DNA-Fragments konnte eindeutig die Ähnlichkeit zu Cathepsin-L belegt werden. So beinhaltete das PCR-Fragment die zwei stark konservierten Regionen GCNGG und CGCSWA. Aus der cDNA-Bank wurden über das 275 bp-Fragment zwei Klone mit einem Insert von 1,3 kB identifiziert. Die Sequenzierung zeigte, daß sie identische offene Laserraster enthielten, die ein Protein mit 313 Aminosäuren mit einem errechneten MG von 35.031 Da kodierten (Fig. 2). Die deduzierte Aminosäuresequenz stimmte mit der beim Edman-Abbau ermittelten überein.

Das konservierte ERFNIN-Motiv im Propeptid (EX₃RX₂(V/I)FX₂NX₃IX₃N) charakterisiert das Enzym als Cathepsin-H oder -L. Während Cathepsin-H als Exoprotease charakterisiert ist, wird Cathepsin-L als effiziente Endoprotease klassifiziert. Die Identifizierung der hier beschriebenen Proteasen als Endoproteasen, legt nahe, daß es sich in der Tat um Cathepsin-L Formen handelt. Die Übereinstimmung des Paramecium-Cathepsin-L mit verschiedenen Mammalia-Formen beträgt maximal 35 % (Tab. 1). Auch im Vergleich zur Cystein-Protease aus Tetrahymena beträgt die Übereinstimmung lediglich 30 %.

Tabelle 1

| Cathepsine und Proteasen im Vergleich zu Paramecium-Cathepsin L | SWISSPROT accession No. | % Identität zu | |
|---|----------------------------|-----------------|-------------|
| | | reife Proteasen | Proregionen |
| Type-L Ratte | P07154 | 35 | 21 |
| Cystein Protease Tetrahymena | L03212 | 30 | 23 |
| Type-H Ratte | P00786 | 30 | 19 |
| Type-S Ratte | Q02765 | 31 | 19 |
| Type-B human | P07858 | 21 | 12 |

cDNA-Bibliothek-Screening

Unter Verwendung von ^{32}P -markierten PCR-Fragmenten wurde in der cDNA-Bibliothek nach entsprechenden Klonen gescreent. Die so identifizierten zwei Klonen wurden über Southern-blot-Verfahren analysiert. Beide codierten eine identische Preprocathepsin-L-Protease.

Bakterielle Expression des Cathepsin-L-Propeptids

Das klonierte Gen enthält eine potentielle Propeptidregion von AS -1 bis -86. Der offene Leserahmen enthält fünf universelle TAA Stopcodons, die bei Paramecium für Q codieren. Vor der Expression wurden sie über "site-directed" Mutagenese in CAA (codiert Q) geändert.

Das die Propeptidregion enthaltende DNA-Fragment wurde über PCR amplifiziert und für die Expression in den hitzeinduzierbaren Vektor pEV41C eingebracht, der zusätzlich ein hexa-His tag enthielt. Die für die PCR verwendeten Primer

waren 5'-AGGTCGTCATATGAATCTTATGCAAATTGG (sense) und 5'-ATCCT-
CGAGTCACTTGTATTGGAAGTTAG (antisense). Nach der Transformation
wurde das Propeptid in *E. coli* Stamm 2136 exprimiert. Die Expression wurde
induziert durch Zugabe von LB_{smp}-Medium, vorgewärmt auf 42°C.

Nach der Ernte wurden die Zellen homogenisiert und die Zelldebris durch
Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde über eine Ni-Affinitäts-Säule
(Qiagen) gereinigt. Die Elution des Proteins wurde mittels 20 mM Tris/HCl (pH
7,5), 8,6 % Glycerin, 200 mM NaCl und 500 mM Imidazol durchgeführt. Dabei
eluierte erwartungsgemäß ein Protein mit einer Größe von 13,6 kDa.

Im Hemmtest hemmte das Propeptid bereits in einer Konzentration von 60 nM
das 30 kDa Cathepsin-L Isozym aus Paramecium zu 50 % (Fig. 1). Andere
Proteasen (Papain, Cathepsin-H aus humaner Leber, Cathepsin-B aus
Rinderniere, Cathepsin-G aus Leukocyten) wurden selbst bei
Propeptidkonzentrationen von 13 μ M nicht inhibiert.

Patentansprüche:

1. Präproform des Cathepsin-L erhältlich aus Ciliaten.
2. Präproprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Ciliat *Paramecium* ist.
3. Präproprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Ciliat *Paramecium tetraurelia* ist.
-) 4. DNA-Sequenz kodierend für eine Präproform des Cathepsin-L gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2.
5. DNA-Sequenz gemäß Fig. 2.
6. Antisense-Strang der DNA-Sequenz gemäß Fig. 2.
7. Aminosäuresequenz gemäß Fig. 2.
8. Präsequenz der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 4.
-) 9. Leadersequenz aus der Präproform des Cathepsin-L gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2.
10. Präsequenz entsprechend den Basen Nr. 1 bis 86 der DNA-Sequenz gemäß Fig. 2.
11. Antisense-Strang der Sequenz gemäß Anspruch 10.
12. Kodierende Präsequenz der Sequenz gemäß Anspruch 10, entsprechend den Basen Nr. 21 bis 86 der DNA-Sequenz gemäß Fig. 2.

13. DNA-Sequenz nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß sämtliche TAA-Codons durch solche Codons ersetzt sind, die in dem entsprechenden Expressionssystem für Q codieren.
14. DNA-Sequenz nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sämtliche TAA-Codons durch CAA-Codons ersetzt sind.
15. Antisense-Strang der Sequenz gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14.
16. Aminosäuresequenz entsprechend den Aminosäuren Nr. -108 bis -87.)
17. Proregion der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 4.
18. Propeptid enthalten in der Präproform des Cathepsin-L gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2.
19. Proregion der DNA-Sequenz gemäß Fig. 2, entsprechend den Basen Nr. 87 bis 347.
20. Proregion nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sämtliche TAA-Codons durch solche Codons ersetzt sind, die in dem entsprechenden Expressionssystem für Q codieren.)
21. Proregion nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß sämtliche TAA-Codons durch CAA-Codons ersetzt sind.
22. Antisense-Strang gemäß einem der Ansprüche 19 oder 21.
23. Propeptid der Aminosäuresequenz gemäß Fig. 2, entsprechend den Aminosäuren Nr. -86 bis -1.

24. Cathepsin-L, erhältlich aus Ciliaten.
25. Cathepsin-L nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß der Ciliat *Paramecium* ist.
26. Cathepsin-L nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Ciliat *Paramecium tetraurelia* ist.
27. DNA-Sequenz, entsprechend den Basen Nr. 348 bis 1276 in Fig 2.
28. Kodierende DNA-Sequenz, entsprechend den Basen Nr. 348 bis 965 in Fig. 2.
29. DNA-Sequenz nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß sämtliche TAA-Codons durch solche Codons ersetzt sind, die in dem entsprechenden Expressionssystem für Q codieren.
30. DNA-Sequenz nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß sämtliche TAA-Codons durch CAA-Codons ersetzt sind.
31. Antisense-Strang gemäß einem der Ansprüche 27 bis 30.
32. Aminosäuresequenz, entsprechend den Aminosäuren 1 bis 205 der Aminosäuresequenz gemäß Fig. 2.
33. Verfahren zur Herstellung des Cathepsin-L gemäß einem der Ansprüche 24 bis 26 und 32, dadurch gekennzeichnet, daß man Ciliaten in einem geeigneten Medium kultiviert und man anschließend das Cathepsin-L isoliert.

34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß man das Cathepsin-L aus den Ciliaten-Zellen isoliert.
35. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß man das Cathepsin-L aus dem Medium isoliert.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß der Ciliat Paramecium ist.
37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß der Ciliat Paramecium tetraurelia ist.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß das Cathepsin-L die Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 32 besitzt.
39. Cathepsin-L gemäß einem der Ansprüche 24 bis 26 und 32 zur Anwendung als Arzneimittel.
40. Verwendung des Cathepsin-L gemäß einem der Ansprüche 24 bis 26 und 32 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Wunden.
41. Wundsalbe enthaltend Cathepsin-L gemäß einem der Ansprüche 24 bis 26 und 32.
42. Verwendung von Cathepsin-L gemäß einem der Ansprüche 24 bis 26 und 32 zur Identifizierung eines Cathepsin-L-Inhibitors.
43. Cathepsin-L-Propeptid gemäß Anspruch 18 oder 23 zur Anwendung als Arzneimittel.

44. Verwendung des Cathepsin-L-Propeptids gemäß Anspruch 18 oder 23 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen.
45. Verwendung des Cathepsin-L-Propeptids gemäß Anspruch 18 oder 23 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von metastasierenden Tumoren.
46. Verwendung des Cathepsin-L-Propeptids gemäß Anspruch 18 oder 23 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von bakteriellen Infektionen.
47. Verwendung des Cathepsin-L-Propeptids gemäß Anspruch 18 oder 23 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Infektionen mit parasitären Protozoen.
48. Verwendung des Cathepsin-L-Propeptids gemäß Anspruch 18 oder 23 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Osteroporose.
49. Verfahren zur Herstellung von Cathepsin-L- gemäß einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß man unter Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 29 das Cathepsin-L in einem heterologen Expressionssystem exprimieren läßt.
50. Verfahren zur Herstellung des Cathepsin-L-Propeptids gemäß einem der Ansprüche 18 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß man unter Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 20 das Propeptid in einem heterologen Expressionssystem exprimieren läßt.
51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß das Expressionssystem *E. Coli* ist.

52. Verfahren nach Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 21 mittels eines hitzeinduzierbaren Vektors in *E. Coli* eingeschleust wird.
53. Verwendung der Präsequenz gemäß Anspruch 8 zur Translation in eine Leadersequenz gemäß Anspruch 9, welche als Signal zur Ausschleusung rekombinant exprimierter Peptide oder Proteine in Ciliaten dient.
54. Verwendung der Präsequenz gemäß Anspruch 10 oder 12 zur Translation in eine Leadersequenz gemäß Anspruch 15, welche als Signal zur Ausschleusung rekombinant exprimierter Peptide oder Proteine in Ciliaten dient.
55. Verwendung des Cathepsin-L-Propeptids gemäß Anspruch 18 oder 23 oder von Teilen oder Analoga desselben zur Herstellung von Cathepsin-L-Inhibitoren.

Fig. 1

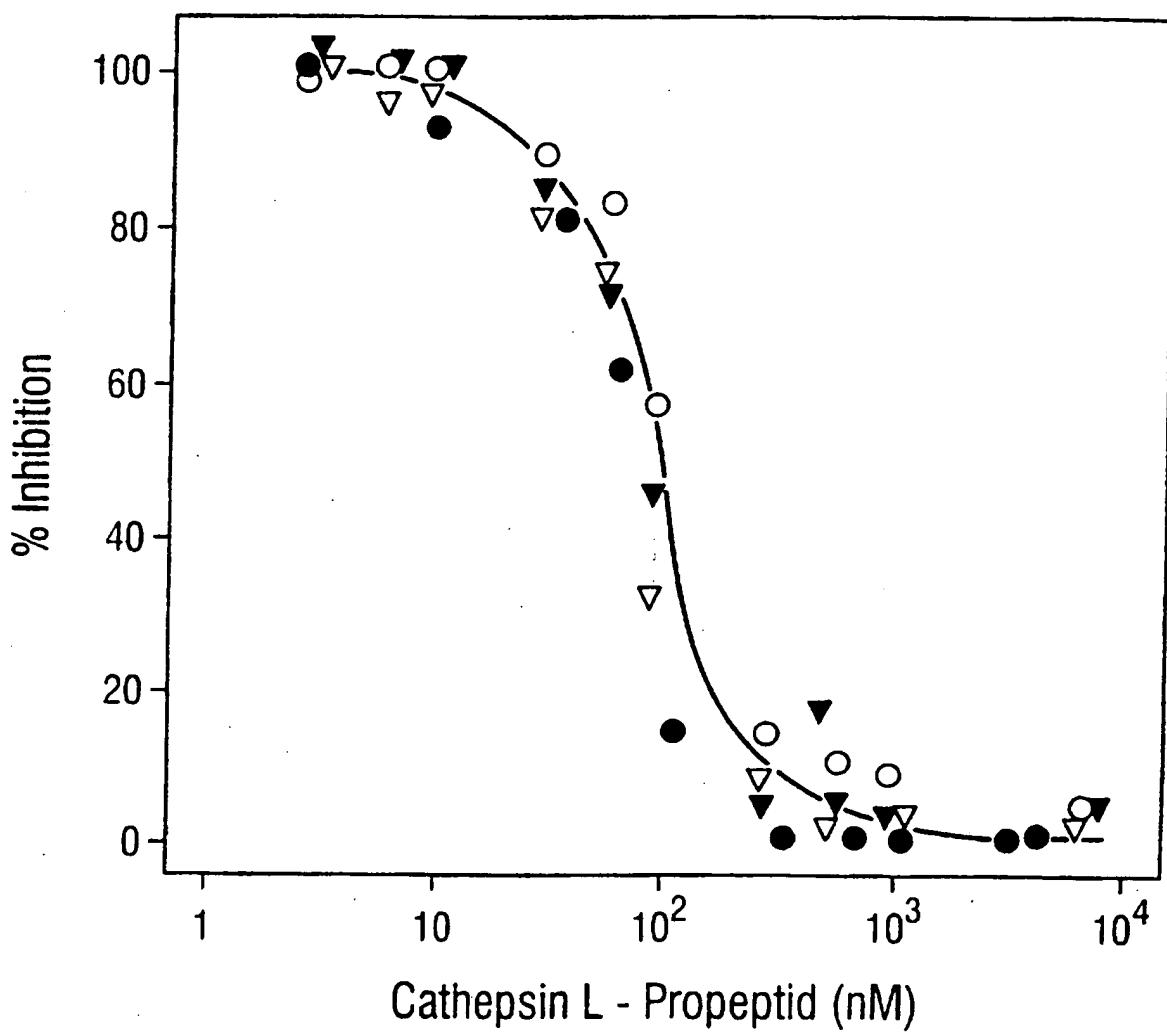


Fig. 2

CATTATAGCAGTCGGTTA 20

ATGATGTTGGAGCCAGCCCTACTGAAATCGACAAACATAAGAAGTATCTGATGAAATGCCAAATCTTTATGCCAAATTGGAAA 110
 M M L L G A S L Y L N N T Q E V S D E I D T A N L Y A N W K -79

ATGAAATATAACAGAAGATAACCAACTAAAGAGATGAAATGACAGATAAGGTTTACAGACAACCTTAACCTAACATCAGAGCTTTC 200
 M K Y N R R Y T N Q R D E M Y R Y K V F T D N L N Y I R A F -49

TATGAAAGTCAGAAGAACGCCACATTCACTTGAATTGAAATTGCTGATATGAGCTAATAAGAATTGCTTAAACCTATTGAGC 290
 Y E S P E E A T F T L E L N Q F A D M S Q Q E F A Q T Y L S -19
 2/3

CTCAAAAGTCCAAGAACAGCCAAACTTAATGCCGCCAATTCTAACTCTAAACTTGAAGGGTGCAGAAGTCGATTGGACTTGACAATAAGAAG 380
 L K V P R T A K L N A A N S N F Q Y K G A E V D W T D N K K 11

GTTAAAGTATCCAGCTGTTAGAAACTAAGGATCATGGCTGGGCTCATGCTGGAGCACATTGAATCAACACAGACATT 470
 V K Y P A V K N Q G S C G S C W A F S A V G A L E I N T D I 41

GAACCTCAACAGAAATAACGAATAATCTGAATAAGATTGGTTGACTGCTCAGGACCATATGCAATGGATGGATGGATG 510
 E L N R K Y E L S E Q D L V D C S G P Y D N D G C N G G W M 71

GATTCTGCTTTGAATATGTTGCTGACAACGGTTGGCTGAAGCTAAAGATTATCCATACACTGCTAAAGATGGAAACCTGCAAGACCTCA 650
 D S A F E Y V A D N G L A E A K D Y P Y T A K D G T C K T S 101

Fig. 2 (Forts.)

GTTAAAAGACCCATAACTCACGTCTAAGGATTCAAGGATATTGACTCATGGCATGAATTAGCCTAAACAAATCTAAGAAACAGTCGCT 740
 V K R P Y T H V Q G F K D I D S C D E L A Q T I Q E R T V A 131
 V A V D A N P W Q F Y R S G V L S K C T K N L N H G V V L V 161
 G V Q A D G A W K I R N S W G S S W G E A G H I R L A G G D 191 3 / 3
 ACTTGGGTATCTGGCTCCATCTTCCCAATTAGGATGAAGACTTGTGATTGATTCAATTACATCAACAAATTACATTAGTTATT 1010
 T C G I C A A P S F P I L G *** 205
 TTTAAACTTAAGAAGACTCTGTGATGTTACAGTGAAGGATTGAAAAAGTAGGCACCTCTTAATTGGGAGGGAGCTGCATCAAA 1100
 TGCTCCAGCTAAGGCCTAAGGCTCCAGCTGCTGCCAAATAAGGGCACCAAGGCAACTGTAAGGCAAGCCAGTGAAGGCCCCAGAACCTGA 1190
 CATGGGTGGTTGTGACTGATTACATATAATTTATCATATAATTTATCATATAATTTATCATATAATTTATCATATAATTTATCATATAA 1276

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/EP 97/02388

| | | | | | |
|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | | | | |
| IPC 6 | C12N15/57 | C12N9/50 | C12N15/11 | C12N15/15 | A61K38/48 |
| | C12Q1/37 | A61K38/55 | C12N15/79 | | |

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| P,X | VOELKEL H ET AL: "Cathepsin L is an intracellular and extracellular protease in Paramecium tetraurelia: Purification, cloning, sequencing and specific inhibition by its expressed propeptide." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 238 (1). 1996. 198-206. ISSN: 0014-2956, XP002042623 see the whole document --- | 1-52,55 |
| A | A. KOK AND R. PAESTE: "Lysosomal enzymes of Paramecium caudatum and Paramecium tetraurelia" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 139, no. 1, May 1982, pages 159-169, XP002043164 --- | |

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

- *&* document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

10 October 1997

17.10.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/02388

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| A | E. KESSLER AND M. SAFRIN: "The propeptide of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> elastase acts as an elastase inhibitor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 36, 9 September 1994, MD US, pages 22726-22731, XP002042624 cited in the application see the whole document ----- | 17-23 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

n. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02388

| | | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES | | | | | |
| IPK 6 | C12N15/57 | C12N9/50 | C12N15/11 | C12N15/15 | A61K38/48 |
| | C12Q1/37 | A61K38/55 | C12N15/79 | | |

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| P,X | VOELKEL H ET AL: "Cathepsin L is an intracellular and extracellular protease in Paramecium tetraurelia: Purification, cloning, sequencing and specific inhibition by its expressed propeptide." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 238 (1). 1996. 198-206. ISSN: 0014-2956, XP002042623 siehe das ganze Dokument --- | 1-52,55 |
| A | A. KOK AND R. PAESTE: "Lysosomal enzymes of Paramecium caudatum and Paramecium tetraurelia" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, Bd. 139, Nr. 1, Mai 1982, Seiten 159-169, XP002043164 --- | -/- |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10. Oktober 1997

17. 10. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Van der Schaal, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

nichtes Aktenzeichen
PCT/EP 97/02388

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | E. KESSLER AND M. SAFRIN: "The propeptide of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> elastase acts as an elastase inhibitor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 269, Nr. 36, 9. September 1994, MD US, Seiten 22726-22731, XP002042624 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ----- | 17-23 |